

PGT

ORGANISATION MONDIALE DE LA PROPRIÉTÉ INTELLECTUELLE
Bureau international

REDACTION INTERNATIONALE PUBLIEE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATTERE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets 6 : C12N 5/10, 15/86		(11) Numéro de publication internationale: WO 98/02529 (43) Date de publication internationale: 22 janvier 1998 (22.01.98)
A1		
(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR97/01250 (22) Date de dépôt international: 9 juillet 1997 (09.07.97)		(81) Etats désignés: CA, JP, US, brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).
(30) Données relatives à la priorité: 96/08889 16 juillet 1996 (16.07.96) FR		Publiée Avec rapport de recherche internationale. Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si de telles modifications sont reçues.
(71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): UNIVERSITE PIERRE ET MARIE CURIE (PARIS VI) [FR/FR]; 4, place Jussieu, F-75252 Paris Cedex 05 (FR).		
(72) Inventeurs; e1 (73) Inventeur/Déposants (US seulement): KLATZMANN, David [FR/FR]; 11, rue du Tage, F-75013 Paris (FR). SALZMANN, Jean-Loup [FR/FR]; 70, rue Claude Bernard, F-75005 Paris (FR).		
(74) Mandataires: GUTMANN, Ernest etc.; Ernest Gutmann - Yves Piasseraud S.A., 3, rue Chauveau Lagarde, F-75008 Paris (FR).		

(54) Title: HIGHLY PRODUCTIVE PACKAGING LINES

(54) Thèse: LIGNEES D'ENCAPSIDATION HAUTEMENT PRODUCTRICES

(57) Abstract

The invention concerns a packaging eukaryotic cell for the production of defective infectious viruses carrying a transgene, characterized in that it is deficient in one cell function essential to its growth, in particular in the presence of a selection culture medium, the said function being capable of being restored by the expression of an exogenous sequence introduced in the cell: either with a vector carrying transcomplementing functions of packaging cells; or with a vector carrying a transgene, and enabling the selection in a selective medium of cells carrying the said exogenous sequence.

(57) Abrégé

L'invention concerne une cellule eucaryote d'empaquetage pour la production de virus infectifs déficitaires porteurs d'un transgène, caractérisée en ce qu'elle est déficiente dans une fonction cellulaire essentielle à sa croissance, notamment en présence d'un milieu de culture de sélection, ladite fonction étant susceptible d'être restaurée par l'expression d'une séquence exogène introduite dans la cellule; soit avec un vecteur porteur de fonctions transcryptables des cellules d'empaquetage, soit avec un vecteur porteur du transgène, et permettant la sélection en milieu sélectif des cellules porteuses de ladite séquence exogène.

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AL	Albanie	ES	Espagne	LS	Lésotho	SI	Slovénie
AM	Armenie	FI	Finlande	LT	Lituanie	SK	Slovénie
AT	Autriche	FR	France	LU	Luxembourg	SN	Sénégal
AU	Australie	GA	Gaïte	LV	Lettonie	SZ	Swaziland
AZ	Azerbaïdjan	GB	Royaume-Uni	MC	Mosaco	TD	Tchad
BH	Bosnie-Herzégovine	GE	Géorgie	MD	République de Moldova	TG	Togo
BD	Barbade	GH	Ghana	MG	Madagascar	TJ	Tadjikistan
BE	Belgique	GN	Guinée	MK	Ex-République yougoslave de Macédoine	TN	Turkménistan
BF	Burkina Faso	GR	Grece	ML	Mali	TR	Turquie
BG	Bulgarie	HU	Hongrie	MN	Mongolie	TT	Tرينidat-et-Tobago
BJ	Bénin	IE	Irlande	MR	Mauritanie	UA	Ukraine
BR	Brésil	IL	Israël	MW	Malawi	UG	Ouganda
BY	Bélarus	IS	Islande	MX	Mexique	US	Etats-Unis d'Amérique
CA	Canada	IT	Italie	NZ	Nigéria	UZ	Ouzbekistan
CF	République centrafricaine	JP	Japon	NL	Pays-Bas	VN	Viet Nam
CG	Congo	KE	Kenya	NO	Norvège	YU	Yugoslavie
CR	Costa Rica	KG	Kirghizistan	NZ	Nouvelle-Zélande	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	République populaire démocratique de Corée	PL	Pologne		
CM	Cameroon	KR	République de Corée	PT	Portugal		
CN	Chine	KZ	Kazakhstan	RO	Roumanie		
CU	Cuba	KC	Sainte-Lucie	RU	Fédération de Russie		
CZ	République tchèque	L_C	Liechtenstein	SD	Soudan		
DE	Allemagne	L_L	Sri Lanka	SE	Suède		
DK	Danemark	L_K	Libéria	SG	Singapour		
EE	Estonie	LR					

LIGNEES D'ENCAPSIDATION HAUTEMENT PRODUCTRICES

L'invention a pour objet de nouvelles lignées cellulaires dites lignées d'encapsulation (lignées de packaging) productrices de rétrovirus recombinants à haut titre et utilisables chez l'homme en thérapie génique

Le transfert de gènes par rétrovirus recombinants est actuellement largement utilisé aussi bien pour des travaux expérimentaux que dans le cadre d'essais thérapeutiques.

Les vecteurs rétroviraux utilisés dans ces différentes situations sont habituellement produits par des lignées dites « de packaging » ou d'emballage ou de transcomplémentation, ces trois termes ayant la même signification ; ces lignées sont des cellules ayant été transduites avec des constructions génétiques permettant l'expression constitutive des différentes protéines nécessaires à la fabrication d'une particule rétrovirale contenant les protéines de structures et les enzymes nécessaires à leur infectiosité. L'objet de lignée d'encapsulation est de fournir par transcomplémentation des fonctions « helper », en particulier les gènes codant pour les protéines gag, pol et env, qui ont été enlevées du vecteur génomique porteur d'un transgène dont on recherche l'expression par utilisation d'un virus infectieux défectif. Ces fonctions « helper », dépourvues de la séquence ψ , sont exprimées de façon stable dans les cellules de transcomplémentation après transfection d'un ou plusieurs plasmides les contenant et dont les transcrits RNA ne sont pas encapsidés dans les particules virales suite à la délétion de la séquence d'encapsulation ψ . Quand ces cellules d'encapsulation sont ensuite transférées par des vecteurs porteurs du transgène, les protéines virales gag produites par la cellule de packaging peuvent encapsider le vecteur rétroviral porteur du transgène dans des particules virales qui sont ensuite relarguées dans l'environnement. (pour une revue voir Miller AD Gene Ther. 1990 1 : 5-14).

Sur ce principe général, différents types de lignées de packaging ont été réalisés et sont largement utilisés aujourd'hui. Cependant, ces lignées sont loin d'être optimisées, notamment en fonction de leur utilisation pour un transgène spécifique ou des modalités particulières. En particulier, il n'existe aucun moyen de faire disparaître les cellules transduites administrées aux patients si le transgène ou son produit d'expression induit des effets indésirables (par une expression inadéquate ou une insertion inappropriée). Un autre aspect pour lequel il est important de disposer de cellules d'empaquetage susceptibles d'être détruites en cas de besoin sont des problèmes strictement de sécurité, sachant que des recombinations pourraient conduire à la formation de virus infectieux à partir des lignées d'empaquetage.

Le choix des cellules de départ dans lesquelles peuvent être réalisées des lignées de packaging est extrêmement important au regard des propriétés attendues et de leur utilisation clinique potentielle. A ce jour, la plupart des lignées cellulaires utilisées en clinique sont toutes dérivées de fibroblastes d'origine murine, les cellules NIH-3T3. L'intérêt de ces cellules est qu'elles sont parfaitement caractérisées, qu'elles ne sont pas transformées (elles ne donnent pas de tumeur lorsqu'elles sont réinjectées *in vivo*), qu'elles proviennent d'animaux élevés depuis de nombreuses générations et dont on sait qu'ils ne présentent pas de pathologies particulières (de type neurodégénératif par exemple) qui permettraient de suspecter la présence d'un agent infectieux transmissible chez ces animaux, et donc potentiellement dans les cellules utilisées. De plus, l'utilisation de cellules murines offre un degré de sécurité supplémentaire en cas de contamination par un agent infectieux transmissible inconnu du fait de la restriction d'espèces fréquemment observée en pathologie infectieuse. Cependant, l'un des défauts dont souffrent les cellules murines est dû au fait que les virus produits par ces cellules, et les cellules elles-mêmes sont la plupart du temps rapidement neutralisées par le complément humain. Un moyen simple de palier ce

défaut est de produire des cellules de packaging à partir de cellules humaines ou d'une autre espèce mais résistante au complément humain.

Cependant, dans le cas des cellules humaines, elles sont souvent transformées et ont donc un potentiel tumoral. De plus, on ne connaît évidemment pas de façon détaillée l'origine des cellules et leur contamination possible par des agents infectieux d'origine inconnue et capables d'infecter l'homme.

Les cellules simiennes pourraient être utilisées comme les cellules humaines pour leur propriété de faire des particules virales qui ne seraient pas détruites par le complément, mais elles ont, de fait, les mêmes défauts que les cellules humaines concernant la possible présence d'agents infectieux.

10 Ce peut être des cellules murines dans lesquelles ont été transférés des gènes leur conférant une plus grande résistance au complément et/ou au sérum humain.

15 Ces gènes peuvent être notamment le CD46, le CD55, le C₁ inhibiteur (C₁INH), la protéine H, le CR, soluble et notamment une forme multimérique telle que celle décrite dans le brevet FR 9508901.

20 L'objet de la présente invention est de fournir des moyens pour la préparation de nouvelles lignées d'encapsidation remédiant au moins en partie à un ou plusieurs des problèmes précédemment décrits et susceptibles :

- de produire des rétrovirus recombinants à des titres élevés ;
- d'être bien tolérées ;
- d'être résistantes au complément, tout en restant acceptables quant à leur sécurité ;
- d'être faciles à produire dans des conditions de bonne pratique de fabrication et ayant une stabilité dans leur expression au moins égale à 3 mois ;

- de disposer d'un gène de sélection permettant une sélection positive de celles des cellules de sang qui ont incorporé le vecteur porteur du transgène ;

5 - de disposer d'un système de sécurité permettant de détruire les cellules en tant que de besoin.

Pour aboutir à ces différents prérequis, il est nécessaire d'optimiser, d'une part, le choix des lignées cellulaires de départ, ainsi que le choix de chacun des constituants nécessaires à l'obtention de la particule rétrovirale recombinante infectieuse défective, en particulier, le 10 choix des vecteurs permettant de rendre la cellule de packaging productrice des protéines gag, pol et env du rétrovirus.

En ce qui concerne la production de ces cellules dans des cultures en masse réalisées en condition de bonne pratique de fabrication (GMP) pour la production de cellules ou de virus à usage clinique, il est nécessaire d'avoir des cellules dont les caractéristiques de croissance soient parfaitement connues, avec des temps de division brefs, poussant à 15 haute densité, le cas échéant, en suspension.

Enfin, il est nécessaire de pouvoir sélectionner à partir des cellules utilisées des transfectants stables exprimant les différents transgènes d'intérêt. Actuellement, on utilise la transduction des cellules de packaging par un vecteur unique portant le gène d'intérêt et un gène dit de sélection, ou par deux vecteurs séparés. Lors de la culture ultérieure des cellules transduites, il est en général nécessaire de maintenir la sélection pour ne pas perdre le transgène d'intérêt. Cependant, il est connu que différents types de modification peuvent aboutir à la perte 20 d'expression du gène thérapeutique, même en présence de cette sélection. Ceci est particulièrement vrai lorsque le transgène a une certaine toxicité conférant alors un avantage sélectif aux rares cellules l'ayant perdu. L'utilisation possible de cellules déficientes en certains enzymes 25 permettant leur sélection sur ce critère serait donc un avantage supplémentaire, surtout lorsque le gène d'intérêt thérapeutique 30

complémentante la déficience. En d'autres termes, l'utilisation comme gène de sélection, au lieu d'un gène de résistance à un toxique (un antibiotique en général), d'un gène supplémentant une déficience génétique de la cellule présente de nombreux avantages dont l'un est la possibilité de cultiver lesdites cellules en l'absence du toxique. De plus, si ce gène est aussi le gène d'intérêt, il n'est plus possible de le perdre au cours de la sélection même lorsqu'il confère un désavantage sélectif. Ce gène peut aussi être un gène dit « de sécurité » ou « gène suicide » ce qui signifie que le produit d'expression de ce gène en présence d'une substance exogène conduit à la destruction spécifique de la cellule.

10 L'invention a donc pour objet des cellules eucaryotes d'empaquetage pour la production de virus infectieux défectifs porteurs d'un transgène caractérisée en ce qu'elles sont déficientes en une fonction cellulaire essentielle à leur croissance, notamment en présence d'un milieu de culture de sélection, ladite fonction étant susceptible d'être restaurée par l'expression d'une séquence exogène introduite dans la cellule :

- 15 - soit avec un vecteur porteur des fonctions transcomplémentantes des cellules d'empaquetage ;
- soit avec un vecteur porteur du transgène ;
20 - l'expression de la séquence exogène ainsi introduite dans la cellule permettant la sélection en milieu sélectif des cellules porteuses de ladite séquence.

25 La cellule eucaryote d'empaquetage selon l'invention est caractérisée par le fait qu'elle vérifie l'un ou plusieurs des propriétés suivantes .

- elle est susceptible de produire des particules virales à un taux supérieur à 10^5 particules par ml ;
- elle est résistante au complément ou elle produit des particules virales résistantes au complément ;
30 - elle a un temps de division inférieur à 30 heures ;

- elle est stable au moins 3 mois dans un milieu de culture non sélectif ;

- elle est dépourvue de rétrovirus endogènes.

L'invention porte également sur des lignées d'empaquetage productrices de virus infectieux défectifs, porteurs d'un gène d'intérêt thérapeutique dans lequel le gène d'intérêt lui-même porté par un vecteur approprié est utilisé comme gène de sélection de la lignée d'empaquetage susceptible de produire les virus recombinants défectifs.

Sur cette base, plusieurs types de cellules peuvent être utilisés :

des cellules NIH-3T3 TK⁻,

a) les cellules murines NIH-3T3 qui sont actuellement largement utilisées comme cellules de packaging productrices de rétrovirus recombinants utilisés en clinique (Takahara et al. dans Journal of Virology, (1992 juin) 66 (6) 3725-32).

b) des lignées TK⁻ ont déjà été décrites dont des cellules NIH-3T3 TK⁻ (F. Wagner et al., EMBO Journal (1985), Vol 4 n° 3, pages 663-666) ; ces cellules peuvent être tuées lorsqu'elles sont cultivées dans des milieux de culture sélectifs comme le HAT. Alors que si elles sont complémentées pour la fonction thymidine kinase, par exemple celles provenant du virus HSV1-TK, elles peuvent alors pousser en milieu sélectif ; de telles lignées offrent donc la possibilité d'utiliser le gène HSV1-TK comme gène de sélection. Le gène codant pour la thymidine kinase de HSV1 ou un de ses dérivés fonctionnels est aussi largement utilisé comme transgène à titre de prodrogue transformant le ganciclovir ou l'acyclovir en drogue cytotoxique pour la cellule, trouvant ainsi son application dans la destruction sélective de cellules, par exemple de cellules cancéreuses (voir par exemple WO 95/22617).

De manière plus générale, des cellules TK⁻ peuvent être dérivées par mutation de toute cellule susceptible d'être utilisée comme cellule d'empaquetage, par exemple les cellules Vero.

Ainsi, lorsque le gène thérapeutique porté par un vecteur d'expression est introduit dans une cellule de packaging déficiente pour la thymidine kinase, la sélection de la cellule de packaging ayant intégré le vecteur porteur du transgène se fait sur le gène thérapeutique lui-même, permettant ainsi d'augmenter la productivité de la culture en virus recombinants défectifs, les cellules de packaging n'ayant pas intégré le vecteur recombinant étant ipso facto éliminées en milieu sélectif.

De manière plus générale, l'invention porte sur des cellules d'empaquetage déficientes en une fonction cellulaire essentielle à leur croissance et dans laquelle le transgène est susceptible de restaurer la fonction cellulaire déficiente.

Il est important que les vecteurs défectifs infectieux recombinants porteurs d'un transgène soient résistants au complément ainsi qu'aux autres facteurs potentiellement destructeurs de virus ou de cellules dans le sang ou dans les fluides intersticiels ; pour ce faire, les lignées cellulaires de l'invention peuvent avantageusement être elles-mêmes résistantes au complément et donc préférentiellement être issues de cellules humaines ou simiennes et plus particulièrement de singes de l'Ancien Monde ou cellules humaines modifiées.

Dans le cas de cellules humaines ou simiennes, il est important de disposer de cellules dont l'origine est claire, à savoir non porteuses d'agents infectieux d'origine inconnue et capables d'infecter l'homme. La lignée 143 B TK⁻ est une lignée d'origine humaine connue (Manservigi R. et al dans Virology, (1988 Novembre) 167 (1) 284-8) ; elle a un temps de division bref c'est-à-dire d'environ dix-huit heures et elle produit des particules virales résistantes au complément. Elle peut donc avantageusement être utilisée comme cellule de packaging de l'invention. Les cellules Vero sont également largement utilisées notamment pour la production de vaccins ; ce sont des cellules simiennes qui produisent également des particules virales résistantes à la neutralisation par le complément ; les conditions de culture de ces lignées sont parfaitement

connues et une lignée déficiente en thymidine kinase pourra être obtenue par les techniques classiques et être avantageusement utilisée après transformation par les vecteurs permettant la construction de packaging, comme lignée d'empaquetage ayant les caractéristiques des lignées de l'invention.

La fonction d'une lignée cellulaire d'empaquetage de rétrovirus est de fournir les fonctions transcomplémentantes qui ont été déléitées du vecteur recombinant porteur du transgène, ces fonctions étant essentiellement les gènes codant pour les protéines gag, pol et env. Ces fonctions sont exprimées de façon stable dans les cellules de packaging à partir d'un ou de préférence deux moins deux plasmides distincts afin de réduire très fortement la possibilité de générer des particules recombinantes compétentes pour la réPLICATION. Des lignées de packaging existantes ont été réalisées à partir de protéines rétrovirales murines ou aviaires et sont décrites dans Miller AD, Hum Gene Ther, 1990 1: 5-14

Les gènes gag et pol des rétrovirus murins sont synthétisés habituellement par le même ARN qui donne naissance à des précurseurs gag ou des précurseurs gag/pol par décalage du cadre de lecture. Ces processus sont bien optimisés dans la particule rétrovirale de type Moloney et les constructions destinées à faire la cellule d'empaquetage de l'invention ne toucheront pas à la structure LTR gag/pol, à l'exception de la délétion de Ψ. Le choix des gènes gag/pol ainsi que des LTR sera fait en fonction de l'objectif qui est d'avoir un taux élevé de particules virales recombinantes défectives produites élevé et par conséquent l'expression la plus forte possible de ces gènes gag/pol est recherchée.

Selon un mode de réalisation de l'invention, les cellules d'encapsidation sont caractérisées en ce qu'elles comprennent :

- un vecteur porteur d'un LTR lui-même caractérisé par une bonne efficacité de transcription par exemple le LTR du virus de Friend FB29 (voir WO 96/17071) ;

- une région gag/pol issue, soit du virus de Moloney, soit du virus de Friend ou de tout autre rétrovirus à partir du moment où la structure et l'expression de cette fonction sont optimisées;

5 c) un gène de sélection quantitative c'est-à-dire tel que lorsque l'on augmente la pression de sélection, on augmente a priori le nombre de transcrits synthétisés.

10 Si le gène de sélection de type quantitatif est situé sur le même plasmide que le plasmide codant pour gag et pol, l'augmentation du nombre de transcrits codant pour le gène de sélection augmente de la même manière que le nombre de transcrits codant pour gag et pol. L'optimisation sera encore améliorée si l'on fait en sorte que la traduction du gène de sélection soit plus faible que celle de gag/pol.

15 Pour ce faire, le gène de sélection est situé soit à environ une centaine de paires de bases du codon stop de pol, soit sous le contrôle d'une séquence IRES normale ou mutée (pour Internal Ribosome Entry Sites) de telle façon que l'initiation de la traduction soit moins efficace que celle des gènes gag et pol. La mutation peut consister à supprimer l'ATG principal, l'initiation se faisant alors sur un ATG moins performant préexistant ou généré par mutation.

20 Les séquences IRES sont des séquences qui ont été utilisées dans des constructions rétrovirales pour maîtriser la traduction des transcrits d'ARN polycystroniques. Les séquences IRES peuvent initier directement une traduction dans un codon d'initiation. Ainsi, l'inclusion d'une telle séquence peut permettre d'exprimer plusieurs gènes à partir du même promoteur.

25 L'autre alternative qui est de situer le gène de sélection à environ une centaine de bases du codon stop de pol permet également d'atténuer la traduction du gène de sélection par rapport à la traduction des gènes gag/pol.

30 Le gène de sélection peut également être situé sur le vecteur porteur du gène env quand celui-ci est distinct de celui portant gag/pol;

enfin les deux vecteurs de construction de la cellule de packaging peuvent l'un et l'autre porter un gène de sélection.

Les gènes de sélection peuvent par exemple être des gènes de type BSR c'est-à-dire de résistance à la blasticidine S ou un gène de résistance à la zéomicine. Le gène de résistance à la blasticidine est un gène de sélection pour les cellules animales qui a été décrit notamment par IZUMI M et al dans Experimental Cell Research (1991), 197 : 229-233. Ce gène semble particulièrement efficace puisqu'il a été notamment utilisé comme marqueur de sélection pour produire des hybridomes producteurs d'anticorps monoclonaux humains avec un bon rendement (Journal of Immunological methods, 1994, 177 : 17-22).

Un exemple de vecteur particulièrement approprié à la construction des lignées de packaging de l'invention est représenté dans la figure 1a.

Le deuxième vecteur utilisable pour la construction de la cellule d'empaquetage est porteur de gènes codants pour les enveloppes de rétrovirus. La plupart des gènes codant pour les enveloppes de rétrovirus pourraient avoir un certain degré de toxicité pour la cellule ; or, il est nécessaire d'avoir des quantités suffisante de protéines d'enveloppe qui soient synthétisées pour que les particules rétrovirales recombinantes défectives soient bien infectieuses.

Les séquences env codant pour les peptides dérivés d'une enveloppe, par exemple enphrotrope peuvent être par exemple l'enveloppe 4070a du virus de la leucémie murine de Moloney (MoMuLV). Mais, tout type de gène codant pour une protéine d'enveloppe susceptible d'être intégrée dans la membrane cellulaire au moment du bourgeonnement du rétrovirus est utilisable ; le choix de la protéine env peut être guidé par la nature du récepteur de la cellule cible que l'on souhaite transfecter par le virus rétroviral recombinant défectif. Le gène env porté par le plasmide de construction de la cellule d'empaquetage est sous la dépendance de séquences régulatrices de transcription virales ou non virales. Il peut s'agir

de promoteurs forts comme le promoteur du cytomégalovirus (CMV) dans le cadre de constructions génétiques telles que la présélection oblige la cellule à synthétiser des quantités importantes d'enveloppes. Par « promoteur fort », on entend toute séquence d'acide nucléique comportant le site de fixation de l'ARN polymérase ainsi que les sites de fixation des protéines régulatrices et permettant un taux élevé de transcription de la séquence située sous le contrôle dudit promoteur.

Il peut s'agir également de promoteurs inductibles qui permettraient une absence ou une expression faible d'enveloppes qui pourraient être ensuite induites de façon transitoire lors du recueil des particules virales. Par « promoteur inductible », on entend une séquence promotrice activable à volonté par une molécule donnée ; ce type de promoteur est utilisé chaque fois que l'on désire déclencher à la demande l'expression d'un gène donné.

Des exemples de promoteurs inductibles susceptibles d'être utilisés dans la construction des cellules d'emballage de l'invention sont les promoteurs inductibles par la tétracycline décrit par Bujard et al. dans Mol and Gen. Genetics, (1977 Dec 9) 157 (3):301-11, ou les promoteurs inductibles conditionnels tel le promoteur RAR- β (Japanese Journal of Genetics, (1993 juin) 68 (3) 175-84) ; les « promoteurs conditionnels » sont constitués d'une séquence promotrice activée par un ou des facteurs trans-régulateurs spécifiquement produits par un tissu donné, mais non nécessairement identifiés, comme par exemple le promoteur de l'insuline sensible à des facteurs strictement pancréatiques.

Ces constructions peuvent s'appliquer à tous les gènes env classiques de type 4070A du virus de la leucémie murine de Moloney (MoMuLV) ou à des enveloppes qui pourraient être utilisées en fonction de leurs propriétés particulières notamment la résistance au complément de type RD114. Des enveloppes de type HTLV1 ou dérivées de lentivirus tels que foamy virus peuvent également être utilisées.

Des gènes d'enveloppe ayant un tropisme particulier pour des cellules cibles susceptibles d'être transfectées par des virus recombinants défectifs produits par les cellules d'empaquetage peuvent être avantageusement utilisés, par exemple des séquences d'enveloppe de spumavirus ayant un tropisme particulier pour les cellules hématopoïétiques humaines.

Enfin, dans le cadre d'un système inductible tel que décrit plus haut, il serait alors possible d'utiliser des enveloppes de type VSV-G.

Le vecteur porteur du gène env comporte en 3' une séquence de polyadénylation telle celle issue du virus SV40. Un exemple de vecteur porteur du gène env est montré dans la figure 1b, dans laquelle ZeoR est le gène de résistance à la zéomicine.

Les deux vecteurs permettant de constituer la cellule de packaging sont bien évidemment dépourvus de séquences d'encapsidation.

Les cellules d'empaquetage recombinantes telles que décrites ci-dessus avec leurs différents modes de réalisation sont susceptibles d'être transfectées par un vecteur rétrovirale recombinant pour l'expression et/ou l'intégration au sein du génome d'une cellule cible d'une séquence de nucléotides choisis (transgène) pour un intérêt thérapeutique. Ce transgène peut être, soit une séquence codant pour une fonction déficiente dans la cellule cible et dans laquelle on souhaite restaurer ladite fonction, ou pour introduire une fonction complémentaire et/ou régulatrice dans la cellule cible, ou encore et sans être limitatif une séquence permettant d'activer des prodrogues comme dans le cas du gène de la thymidine kinase du virus de HSV1 transformant le ganciclovir ou l'acyclovir en drogue毒ique et destructrice des cellules, ou le gène de la cytosine désaminase transformant un précurseur 5 fluorouracile en drogue active ; cela peut être enfin un transgène permettant d'induire ou de stimuler le système immunitaire, soit par manipulation des cellules tumorales, soit par manipulation des cellules du système immunitaire lui-

même ou au contraire un transgène permettant de spécifiquement inhiber une réponse immunitaire dans le cas par exemple du rejet de greffe ou dans le cas de maladies auto-immunes.

La structure générale d'un vecteur rétroviral porteur du transgène nécessite la présence de deux LTR encadrant le ou les gènes d'intérêt ou transgènes et porte la région permettant l'encapsulation du transcript dans la particule pseudo-rétrovirale dont les protéines de structure sont codées par la cellule d'empaquetage de l'invention.

En ce qui concerne les LTR utilisés, seront préférés, soit ceux dérivés des souches de Moloney, tels que ceux dérivés des souches Moloney (réf Jaenish) pour leur plus grande capacité à s'exprimer dans des cellules peu ou non différenciées que sont entre autres les cellules tumorales et, décrits dans la demande de brevet EP n° 0674716 où les LTR dérivés des virus de Friend pour leur haut taux d'expression comme cela a été décrit ci-dessus.

L'invention porte également sur des vecteurs rétroviraux recombinants porteurs d'un gène hétérologue dont l'expression est recherchée dans une cellule cible, caractérisée en ce qu'ils comportent :

- un gène d'intérêt thérapeutique X, sous le contrôle d'un promoteur,
- une séquence nucléotidique Y dont l'expression complémentaire la fonction déficiente dans la cellule d'empaquetage,
- une séquence d'encapsulation Ψ,
- le cas échéant un gène de sécurité Z dont l'expression en présence d'une substance exogène conduit à la destruction de la cellule transfectée ou infectée.

Quand le transgène d'intérêt thérapeutique est un gène suicide par exemple celui codant pour HSV1-TK ou l'un de ses dérivés fonctionnels, les séquences X et Y ou Y et Z ne forment qu'un seul et même gène, et l'utilisation d'un tel vecteur permet de sélectionner lesdites cellules d'empaquetage qui ont été transfectées par ledit vecteur.

Un bon titre viral dépend du nombre de transcrits encapsidables produits par la cellule d'empaquetage.

L'invention porte également sur le procédé d'obtention de virus recombinants infectieux défectifs à haut titre dans les cellules telles que décrites ci-dessus et comprenant :

- a) l'infection ou la transfection desdites cellules par un vecteur recombinant porteur au moins d'un gène d'intérêt thérapeutique X :

 - une séquence nucléotidique Y dont l'expression complémentaire la fonction déficiente de la cellule d'empaquetage si cette déficiente subsiste après construction de ladite cellule d'empaquetage par les vecteurs porteurs des gènes gal, pol et env ;
 - une séquence d'encapsidation ψ ;
 - et le cas échéant un gène de sécurité Z dont l'expression en présence d'une substance exogène conduit à la destruction de la cellule transfectée ou infectée ;

b) la sélection desdites cellules dans un milieu de culture de sélection dans le cas où la cellule d'empaquetage est déficiente pour une fonction donnée et que le vecteur porteur du transgène supplie cette déficience.

Quand les lignées d'empaquetage sont déficientes en thymidine kinase, le vecteur porteur du transgène sera un vecteur bicistrone permettant la sélection en présence d'un gène thymidine kinase de HSV1 ou un dérivé fonctionnel de celui-ci. Une propriété surprenante du gène HSV1-TK est que un taux d'expression élevé peut entraîner une toxicité pour la cellule, empêchant d'obtenir un nombre élevé de transcrits. Dans ce cas de toxicité du gène, la sélection des cellules productrices aboutit à l'obtention de clones dans lesquels l'expression du gène est faible et donc le titre infectieux très bas. Le vecteur de l'invention, susceptible d'infecter ou de transfacter les cellules d'empaquetage décrites ci-dessus, sera donc construit de telle façon que la production des transcrits encapsidables du transgène soit élevée en comparaison avec la

production des protéines HSV1-TK. Ainsi, une cellule d'empaquetage TK⁺ transfectée par un vecteur bicistronique porteur, d'une part, d'un transgène et, d'autre part, de HSV1-TK ou l'un de ses dérivés peut à la fois être sélectionnée dans le milieu sélectif HAT et être productrice de particules virales à haut titre, tout en évitant une contre-sélection due à l'activité毒ique du HSV1-TK lorsque le gène est traduit activement. Ceci permet donc la réalisation de cellules d'empaquetage disposant d'un titre élevé et qui produisent des rétrovirus défectifs codant, soit pour HSV1-TK seul, soit pour un gène d'intérêt et HSV1-TK.

Cette différence dans la production de transcrits du transgène X, d'une part, et de Y, d'autre part, est réalisée par la construction de vecteurs recombinants dans laquelle la séquence nucléotidique Y dont l'expression complémentaire la fonction déficiente de la cellule d'empaquetage, par exemple HSV1-TK, est située soit à environ une centaine de paire de bases du codon stop du transgène, soit sous le contrôle d'une séquence de type IRES normale ou mutée telle que décrite ci-dessus de telle façon que l'initiation de la traduction de la séquence Y soit moins efficace que celle de la séquence X.

Dans le cas où le transgène est lui-même le gène permettant la sélection des cellules d'empaquetage, c'est-à-dire dans le cas où X et Y sont un seul et même gène (par exemple HSV1-TK), le gène d'intérêt lui-même est utilisé comme gène de sélection. Au contraire, quand le gène X et le gène Y sont différents, le gène Y peut alors assurer également une fonction de gène de sécurité Z car il permet le cas échéant de détruire les cellules transfectées avec le gène thérapeutique par traitement du malade avec une substance transformant la prodrogue en drogue toxique.

Dans le cas où la séquence Y et le cas échéant la séquence Z codent pour HSV1-TK, un exemple de réalisation du vecteur recombinant de l'invention est représenté sur la figure 2.

Dans cette figure, les deux vecteurs représentés montrent la différence entre les deux modes de réalisation permettant une moindre

expression du gène HSV1-TK (séquences Y et Z réunies), soit par une certaine distance du codon stop du gène X, soit par l'introduction d'une séquence IRES. La séquence représentée par gag* signifie que la séquence d'encapsidation peut comprendre non seulement la région 5 génétique nécessaire à l'encapsidation mais également la partie du gène gag muté qui ne permet pas la reconstitution de la protéine gag mais qui peut augmenter l'efficacité d'encapsidation.

Les propriétés de HSV1-TK sont compatibles avec cette conception. En effet, de très faibles quantités de TK sont suffisantes pour 10 pouvoir sélectionner en présence d'un milieu sélectif HAT des clones cellulaires dérivés de cellules TK négatives ; de la même manière, une très faible expression de TK est suffisante pour obtenir une bonne sensibilité au ganciclovir.

Dans certains cas, les trois gènes X, Y et Z ne peuvent 15 représenter qu'un seul gène comme, par exemple, il s'agit du-gène HSV1-TK qui joue à la fois le rôle de transgène, de gène de sélection, et de gène de sécurité. Une construction comme celle-ci présente l'avantage de pouvoir ajouter dans le vecteur un deuxième gène thérapeutique, par exemple un gène qui code pour des cytokines lorsque l'on souhaite 20 éliminer des cellules cancéreuses.

Un autre mode de réalisation de l'invention, lorsque le gène 25 TK est le gène thérapeutique lui-même, peut être caractérisé par le fait que le gène Y peut être un gène codant pour un autre marqueur de sélection par exemple le gène BSR cité plus haut ou un autre gène d'intérêt thérapeutique comme par exemple un gène de cytokine.

Pour une expression optimisée du gène Y, ce dernier peut 30 être placé sous le contrôle d'un promoteur interne faible qui peut être lui-même atténué par un « read through » par le LTR du vecteur rétroviral. Dans cette condition le LTR 3' du vecteur peut également contenir une délétion de l'amplificateur de sorte que ce « read through » n'empêche pas

l'expression après infection de la cellule cible par les particules virales recombinantes.

De manière générale, le procédé d'obtention de virus recombinants défectifs à haut titre peut porter sur tout transgène dont l'absence induit une pression de sélection négative pour la cellule d'empaquetage ; une cellule ainsi délestée du gène codant pour ce transgène serait alors « sauvée » par le vecteur rétroviral qui jouerait en même temps le rôle de vecteur de sélection. Ceci s'appliquerait ainsi à tout gène cellulaire dont la surexpression induit une pression de sélection négative pour la cellule puisque seules les cellules d'empaquetage porteuses et productrices de rétrovirus recombinants seront sélectionnées positivement même dans le cas où l'expression du gène d'intérêt aurait tendance à contre-sélectionner ces cellules

L'invention porte sur l'utilisation des cellules d'empaquetage et des vecteurs décrits ci-dessus dans la préparation d'un médicament de thérapie génique possédant les qualités de sécurité, et d'efficacité requises pour ce type de médicament, à savoir résistants au complément et ayant la possibilité d'être détruits in situ en tant que de besoin.

L'invention porte sur l'utilisation des cellules d'empaquetage selon l'invention et des vecteur recombinants porteurs d'un gène d'intérêt tel que décrit ci-dessus à la transformation de cellules cibles du système immunitaire telles les cellules souches hématopoïétiques, des cellules lymphocytaires ou des cellules cancéreuses.

L'invention porte également sur l'utilisation des cellules d'empaquetage telle que décrite plus haut dans un procédé de coculture de cellules cibles d'un rétrovirus infectieux défectif porteur d'un gène d'intérêt en thérapie génique et produit par les cellules d'empaquetage, ces dernières devant être impérativement détruites avant utilisation desdites cellules cibles ainsi transformées en médicaments. Il est connu en effet que certaines indications nécessitent cette coculture in vitro de la cellule cible et de la cellule d'empaquetage, par exemple quand la cellule

cible est une cellule du système lymphocytaire ou des cellules souches hématopoïétiques. La cellule d'empaquetage doit impérativement être éliminée avant la réintroduction de la cellule cible ainsi transformée. Quand la cellule d'empaquetage est porteuse du gène HSV1-TK comme 5 gène de sélection par exemple, l'utilisation d'un milieu de culture contenant du HAT en présence de ganciclovir et d'acyclovir peut permettre de détruire sélectivement les cellules portant le gène HSV1-TK et donc la cellule d'empaquetage au profit des seules cellules cibles transfectées par le virus rétroviral produit par lesdites cellules d'empaquetage.

10 Un autre mode de réalisation dans le cas de coculture peut être réalisé avec des cellules d'empaquetage directement dépourvues du gène HSV1-TK et la sélection du mélange cellulaire en présence du milieu sélectif HAT en maintenant une concentration cellulaire adéquate fait également disparaître les cellules d'empaquetage sans altérer les cellules 15 cibles.

REVENDICATIONS

1 Cellule eucaryote d'empaquetage pour la production de virus infectieux déficients porteurs d'un transgène, caractérisée en ce qu'elle est déficiente en une fonction cellulaire essentielle à sa croissance, notamment en présence d'un milieu de culture de sélection, ladite fonction étant susceptible d'être restaurée par l'expression d'une séquence exogène introduite dans la cellule :

- soit avec un vecteur porteur de fonctions transcomplémentantes des cellules d'empaquetage ;
- soit avec un vecteur porteur du transgène, et permettant la sélection en milieu sélectif des cellules porteuses de ladite séquence exogène.

2. Cellule eucaryote selon la revendication 1 caractérisée par le fait qu'elle vérifie l'une ou plusieurs des propriétés suivantes :

- elle est susceptible de produire des particules virales à un taux supérieur à 10^5 particules par ml ,
 - elle est résistante au complément ou elle produit des particules virales résistantes au complément ;
 - elle a un temps de division inférieur à 30 heures ;
 - elle est stable au moins 3 mois dans un milieu de culture non sélectif ,
 - elle est dépourvue de rétrovirus endogènes

3. Cellule selon l'une des revendications 1 ou 2 caractérisée en ce qu'elle provient d'une cellule humaine ou simienne.

4. Cellule selon l'une des revendications 1 à 3 caractérisée en ce que le transgène lui-même est susceptible de restaurer la fonction cellulaire déficiente.

5. Cellule selon la revendication 4 caractérisée en ce que le transgène est le gène codant pour la thymidine kinase ou pour un dérivé fonctionnel de celle-ci.

6. Cellule selon l'une des revendications 3 à 5 issue de la lignée 143 B TK ou d'une cellule Vero, 3T3-TK⁻.

7. Cellule selon l'une quelconque des revendications précédentes, modifiée par transfection avec au moins deux vecteurs rétroviraux porteurs :

- pour le premier, des gènes gal/pol, sous le contrôle d'un promoteur de type LTR, une séquence de polyadénylation, le cas échéant des signaux régulateurs de transcription de gag et pol ;

- pour le deuxième, un gène codant pour une protéine d'enveloppe, sous le contrôle d'un promoteur qui sera avantagusement choisi parmi les promoteurs forts de type pCMV ou parmi les promoteurs inductibles, une séquence de polyadénylation ;

- au moins un gène de sélection pour l'établissement de la cellule en lignée de packaging qui peut être situé sur le premier ou le deuxième vecteur ;

- les susdits premiers et deuxièmes vecteurs étant dépourvus de séquence d'encapsidation.

8. Cellule d'empaquetage selon la revendication 7 caractérisée en ce que un gène de sélection est situé sur le premier vecteur et peut être notamment un gène de résistance à la Blasticidine S (gène BSR) ou à la Zeomycine (gène ZeoR).

9. Cellule d'empaquetage selon la revendication 7 ou 8 caractérisée en ce que le gène de sélection est situé, soit à environ une centaine de paires de bases du codon stop de pol, soit sous le contrôle d'une séquence de type IRES, normale ou mutée, de telle façon que l'initiation de la traduction du gène de sélection soit moins efficace que celle des gènes gag et pol.

10. Cellule d'empaquetage selon l'une des revendications 7 à 9 caractérisée en ce que le promoteur contrôlant les gènes gag et pol est le LTR du virus de Friend B29

11. Cellule d'empaquetage selon l'une des revendications 7 à 10 caractérisée en ce que le deuxième vecteur contient également un gène de sélection différent de celui situé sur le premier vecteur, ledit gène de sélection étant situé, soit à environ une centaine de paires de bases du codon stop de pol, soit sous le contrôle d'une séquence de type IRES, de telle façon que l'initiation de la traduction du gène de sélection soit moins efficace que celle des gènes gag et pol.

12. Vecteur rétroviral recombinant porteur d'un gène hétérologue X dont l'expression est recherchée dans une cellule cible et porteur d'une séquence ψ caractérisé en ce qu'il comprend :

- une séquence nucléotidique Y dont l'expression complémentaire la fonction déficiente dans la cellule d'empaquetage,
- le cas échéant un gène de sécurité Z dont l'expression en présence d'une substance exogène conduit à la destruction de la cellule transfectée ou infectée.

13. Vecteur selon la revendication 12 caractérisé en ce que X et Y ou Y et Z ou X, Y et Z ne représentent qu'un seul et même gène, et que ledit vecteur permet de sélectionner les cellules d'empaquetage qui contiennent le transgène d'intérêt X.

14. Procédé d'obtention de virus recombinants à haut titre dans des cellules d'empaquetage telles que définies dans l'une des revendications précédentes comprenant :

- a) l'infection ou la transfection desdites cellules par un vecteur recombinant porteur au moins de :
 - un gène d'intérêt thérapeutique X, sous le contrôle d'un promoteur,
 - une séquence nucléotidique Y dont l'expression complémentaire la fonction déficiente dans la cellule d'empaquetage,
 - une séquence d'encapsulation Ψ .

- le cas échéant un gène de sécurité Z dont l'expression en présence d'une substance exogène conduit à la destruction de la cellule transfectée ou infectée,

5 b) la sélection desdites cellules dans un milieu de culture comprenant une substance entraînant la mort de la cellule quand la séquence Y n'est pas exprimée.

10 15. Procédé selon la revendication 14 caractérisé en ce que la séquence Y est située, soit à environ une centaine de paires de bases du codon stop de X, soit sous le contrôle d'une séquence de type IRES, de telle façon que l'initiation de la traduction de la séquence Y soit moins efficace que celle de la séquence X.

16. Procédé selon l'une des revendications 14 et 15 dans lequel les séquences Y et Z sont identiques.

15 17. Procédé selon l'une des revendications 14 et 16 dans lequel le gène d'intérêt thérapeutique X et la séquence Y sont identiques

18. Procédé selon l'une des revendications 14 à 17 caractérisé en ce que la cellule est déficiente en thymidine kinase, telle par exemple les cellules issues de la lignée 143B TK, et la séquence Y est celle du gène de la thymidine kinase de HSV1-TK ou l'un de ses dérivés fonctionnels, les cellules étant alors sélectionnées en milieu HAT, et susceptibles d'être détruites en cas de nécessité en présence de ganciclovir ou d'acyclovir.

20 25 19. Utilisation de cellules d'empaquetage selon l'une quelconque des revendications 1 à 11 dans un procédé de coculture de cellules cibles d'un rétrovirus infectieux défectif porteur d'un gène d'intérêt en thérapie génique et produit par lesdites cellules d'empaquetage, ces dernières devant être détruites avant utilisation desdites cellules cibles ainsi transformées en médicament.

20 30 20. Utilisation selon la revendication 19 où les cellules cibles sont les cellules du système immunitaire telles les cellules souches hématopoïétiques ou des cellules lymphocytaires.

WO 98/02529

PCT/FR97/01250

23

21 Utilisation de cellules d'emballage selon l'une quelconque des revendications 1 à 11 dans la préparation d'un médicament de thérapie génique.

5

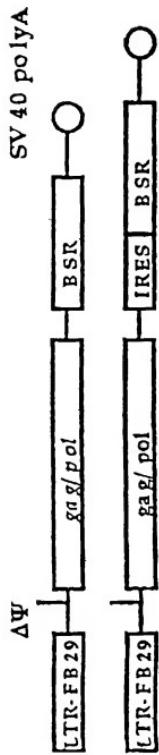


Fig. 1a

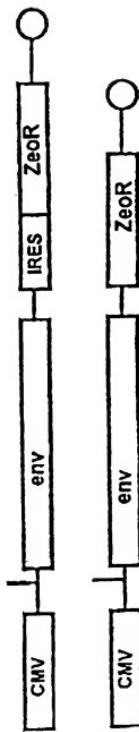


Fig. 1b

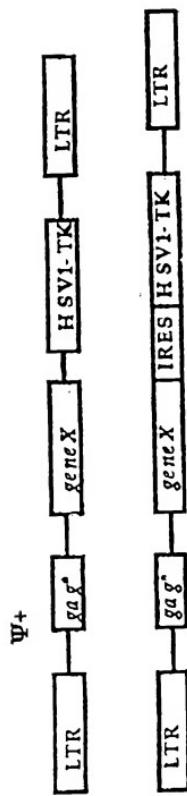


Fig. 2

FEUILLE DE REMPLACEMENT (REGLE 26)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int'l. Patent Application No.
PCT/FR 97/01250A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 6 C12N5/18 C12N15/86

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim no.
X	TAKAHARA Y ET AL: "A NEW RETROVIRUS PACKAGING CELL FOR GENE TRANSFER CONSTRUCTED FROM AMPLIFIED LONG TERMINAL REPEAT-FREE CHIMERIC PROVIRAL GENES" JOURNAL OF VIROLOGY, vol. 66, no. 6, June 1992, BALTIMORE US, pages 3725-3732, XP000196773 cited in the application see page 3727, column 1, paragraph 2 - page 3730, column 2, paragraph 1; figures 1-5 see page 3725, column 1, last paragraph - page 3726	1-5, 12-14
X	US 5 470 726 A (MILLER A. DUSTY ET AL.) 28 November 1995 see the whole document	1-3,7, 12,14

 Further documents are listed in the continuation of box C. Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubt on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date but earlier than the priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance, the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step if the document is taken alone

"Y" document of particular relevance, the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"Z" document member of the same patent family

1

Date of the actual completion of the international search

8 October 1997

Date of mailing of the international search report

18.11.97

Name and mailing address of the ISA
European Patent Office, P.B. 5616 Patentkantoor 2
Postbus 2230 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl
Fax. (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Panzica, G

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

page 1 of 2

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int. Jpn. Application No.
PCT/FR 97/01250

C(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 93 10218 A (US GOVT. HEALTH AND HUMAN SERVICES DEPT.) 27 May 1993 see abstract; examples 1-5 see page 6, line 3 - page 8, line 6 ---	1,2,4,5, 7,12-14, 18
X	WO 94 13824 A ((UNIVERSITA PIERRE ET MARIE CURIE) 23 June 1994 see abstract; figure 1 see page 4, line 10-30 see page 5, line 5-26 see claims 1-7 & EP 0 674 716 A 4 October 1995 cited in the application ---	1,4,5, 10, 12-14, 19,21
A	HANSERVIGI R ET AL: "CONSTITUTIVE EXPRESSION IN HUMAN CELLS OF HERPES SIMPLEX VIRUS TYPE 1 GLYCOPROTEIN B GENE CLONED IN AN EPISOMAL EUKARYOTIC VECTOR" VIROLOGY, vol. 167, no. 1, November 1988, ORLANDO US, pages 284-288, XP000196774 cited in the application see the whole document ---	1-6
A	IZUMI M ET AL: "BLASTICIDIN S-RESISTANCE GENE (BSR): A NOVEL SELECTABLE MARKER FOR MAMMALIAN CELLS" EXPERIMENTAL CELL RESEARCH, vol. 197, 1991, NEW YORK US, pages 229-233, XP000196772 cited in the application ---	8
A	WO 96 17071 A (COHEN-HAGUENAUER ODILE) 6 June 1996 cited in the application -----	
1		

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Inte.inal Application No.

PCT/FR 97/01250

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 5470726 A	28-11-95	NONE	
WO 9310218 A	27-05-93	NONE	
WO 9413824 A	23-06-94	FR 2699191 A CA 2150536 A EP 0674716 A JP 8506722 T	17-06-94 23-06-94 04-10-95 23-07-96
WO 9617071 A	06-06-96	FR 2727429 A AU 4306996 A EP 0796338 A	31-05-96 19-06-96 24-09-97

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (Ady 1992)

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Ref. n° internationale No.
PCT/FR 97/01250A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
CIB 6 C12N5/10 C12N15/86

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTÉ

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 6 C12N

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)

C. DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	TAKAHARA Y ET AL: "A NEW RETROVIRUS PACKAGING CELL FOR GENE TRANSFER CONSTRUCTED FROM AMPLIFIED LONG TERMINAL REPEAT-FREE CHIMERIC PROVIRAL GENES" JOURNAL OF VIROLOGY, vol. 66, no. 6, juin 1992, BALTIMORE US, pages 3725-3732, XP000196773 cité dans la demande voir page 3727, colonne 1, alinéa 2 - page 3730, colonne 2, alinéa 1; figures 1-5 voir page 3725, colonne 1, dernier alinéa - page 3726	1-5, 12-14
X	US 5 470 726 A (MILLER A. DUSTY ET AL.) 28 novembre 1995 voir le document en entier	1-3,7, 12,14

 Voir le suiv. du cadre C pour la fin de la liste des documents Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

- *A* document détaillant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- *E* document antérieur, misse publié à la date de dépôt international ou après cette date
- *L* document pouvant donner un indice sur une revendication de priorité, mais pas pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- *O* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- *P* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- *T* document utilisable publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'apportant pas à l'état de la technique pertinent, mais qui pour comprendre le principe ou la théorie constitutrice la base de l'invention
- *X* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle que lorsque cette activité inventrice a été rapportée dans ce document considéré indépendamment
- *Y* document particulièrement pertinent, l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventrice lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents et que cette combinaison n'est pas évidente pour une personne du métier
- *Z* document qui fait partie de la même famille de brevets

1

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

8 octobre 1997

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

18.11.97

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale
Office Européen des Brevets, P. B. 5815 Patenttaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Panzica, G

Formulaire PCT/SA/210 (document feuilleté) (u-fais 1992)

page 1 de 2

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

De la Internationale No
PCT/FR 97/01250

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	WO 93 10218 A (US GOVT. HEALTH AND HUMAN SERVICES DEPT.) 27 mai 1993 voir abrégé; exemples 1-5 voir page 6, ligne 3 - page 8, ligne 6 ---	1,2,4,5, 7,12-14, 18-
X	WO 94 13824 A ((UNIVERSITA PIERRE ET MARIE CURIE) 23 juin 1994 voir abrégé; figure 1 voir page 4, ligne 10-30 voir page 5, ligne 5-26 voir revendications 1-7 & EP 0 674 716 A 4 octobre 1995 cité dans la demande ---	1,4,5, 10, 12-14, 19,21
A	MANSERVIGI R ET AL: "CONSTITUTIVE EXPRESSION IN HUMAN CELLS OF HERPES SIMPLEX VIRUS TYPE 1 GLYCOPROTEIN B GENE CLONED IN AN EPISOMAL EUKARYOTIC VECTOR" VIROLOGY, vol. 167, no. 1, novembre 1988, ORLANDO US. pages 284-288, XP000196774 cité dans la demande voir le document en entier ---	1-6
A	IZUMI M ET AL: "BLASTICIDIN S-RESISTANCE GENE (BSR): A NOVEL SELECTABLE MARKER FOR MAMMALIAN CELLS" EXPERIMENTAL CELL RESEARCH, vol. 197, 1991, NEW YORK US, pages 229-233, XP000196772 cité dans la demande ----	8
A	WO 96 17071 A (COHEN-HAGUENAUER ODILE) 6 juin 1996 cité dans la demande -----	

1

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Don + Internationale No
PCT/FR 97/01250

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
US 5470726 A	28-11-95	AUCUN	
WO 9310218 A	27-05-93	AUCUN	
WO 9413824 A	23-06-94	FR 2699191 A CA 2150536 A EP 0674716 A JP 8506722 T	17-06-94 23-06-94 04-10-95 23-07-96
WO 9617071 A	06-06-96	FR 2727429 A AU 4306996 A EP 0796338 A	31-05-96 19-06-96 24-09-97

Formulaire PCT/ISA/210 (annexe familles de brevets) (juillet 1992)